

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 :蛋白質の折れ畳み過程の実時間測定と応用

### 2. 研究者氏名 :高橋 聡

3. 研究の狙い :蛋白質の折り畳み問題とは、蛋白質を構成するアミノ酸の一次配列の情報をもとに、蛋白質が折り畳んだ構造を推定する問題であり、多くの応用が期待される。本さきがけ研究は、実際の蛋白質が、変性した紐状の状態から機能を持つコンパクトな状態に折り畳む過程を観察することで、折り畳み構造を予測するための情報を得ることを目的とした。

### 4. 研究結果

1)実験装置の開発 :蛋白質の速い折り畳み過程をリアルタイムで観察するために、高速の溶液混合装置を開発した。さらに、蛋白質の二次構造を測定するために円二色性 (CD) 分光法と赤外 (IR) 分光法を、コンパクトさの測定のために X 線小角散乱法を使用した。以上の装置開発を行うことで、50 マイクロ秒の時間分解能で、蛋白質の折り畳みを測定することを可能にした。

2)シトクロム C の折り畳み過程の観測 :シトクロム C の折り畳み過程を、ヘリックス含量とコンパクトさに注目して測定した。シトクロム C の折り畳みが進むにつれ、ヘリックス含量と慣性半径がほぼ同期して段階的に成長することを発見した。シトクロム C が幾つかの部分構造に分けられ、異なるタイミングで折り畳むために、段階的な折り畳みが観察されたと解釈した。

3)ポリグルタミン酸のヘリックス形成過程の観測 :ポリグルタミン酸がヘリックスを形成する過程を観察した。時分割 CD 分光法と時分割 IR 分光法を使い、中性から酸性への pH ジャンプに伴うポリグルタミン酸の構造変化を測定したところ、ポリグルタミン酸は、pH ジャンプの直後 100 マイクロ秒以内に、短いヘリックスが多数形成した状態を作り、さらに数ミ秒の時間をかけて長いヘリックスを作ることを明らかにした。最初に形成する短いヘリックスは、ポリグルタミン酸の側鎖間の水素結合により安定化しているのではないかと推定した。

4)アポミオグロビンの折り畳み過程の観測 :時分割 CD 分光法と時分割 X 線小角散乱法を使って、アポミオグロビンの折り畳み過程の観測を行った。得られた結果は、折り畳みを開始した直後の百マイクロ秒の時点で、新しい折り畳み中間体が存在することを示した。この中間体は、次の中間体程度に慣性半径が収縮しているが、ヘリックスの成長は不十分だった。

5)モネリンの折り畳み過程の観測 : シートを含む蛋白質の折り畳み過程を観察するために、シート蛋白質であるモネリンを実験対象とした。時分割 FTIR 分光法を使い、折り畳み過程を観察したところ、折り畳んだ状態では シートが多いにもかかわらず、折り畳み初期の数百マイクロ秒以内の段階では ヘリックスを多く形成していることを観察した。このヘリックスは揺らいでおり 1 ミ秒程度で消失して シート構造に変化した。この観察から、モネリンが折り畳みの初期にヘリックス構造を作ることで、疎水性残基の収縮を助けているという仮説を立てた。

## 5. 自己評価：

本さきがけ研究により、われわれは蛋白質の折り畳み過程を観察するための新しい実験装置の開発を行った。開発した装置は、サブミ秒で起こる蛋白質の折り畳み過程を、慣性半径と二次構造で性格づけることを世界で初めて可能にした。装置を使い、異なる構造を持つ蛋白質やポリペプチドの折り畳み過程を観察したところ、構造の違いにもかかわらず、段階的に折り畳みが進むことが共通に観察された。これらの結果から、蛋白質は幾つかの部分構造に分かれており、部分構造が次第に組みあがる形で折り畳みが進むのではないかと、という仮説をたてることができる。実験事実に基づいた仮説を提案できることが、本さきがけ研究の第一の成果だと考えている。

上記結果のうち、4)と5)についての論文が遅れていることは反省点である。一方で、結果の2)と3)は、海外でも高い評価を受けた。結果2)を報告した論文[I]には、CommentaryがPNAS誌に同時掲載され、結果3)を報告した論文[II]は、アメリカ化学会のホームページで"Heart Cut Article"として紹介された。

## 6. 研究総括の見解：

アミノ酸の連鎖からなるペプチドが折りたたまれ、機能性を持つたんぱく分子となる過程を明らかにすることは、分子生物学分野の重要な未解決課題として残っている。本研究では、この過程をリアルタイムで観察するために高速の溶液混合装置を開発し、さらに赤外分光、円二色性分光、X線散乱法を50マイクロ秒の時間分解能で測定することに成功した。この結果、シトクロムC、アポミオグロビン、モネリンなどいくつかのたんぱく分子の折りたたみ過程が明らかとなった。これらの成果は世界的に高い評価を受け、一流の専門誌に解説記事が載ったり、米化学会のホームページでの紹介が行われたりした。

## 7. 主な論文等：

- 1) Akiyama, S., Takahashi, S., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Nishikawa, Y., Fujisama, T. Conformational Landscape of Cytochrome c Folding Studied by Microsecond-Resolved Small-Angle X-ray Scattering Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99. 1329-1334 (2002).
- 2) Kimura, T., Takahashi, S., Akiyama, S., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I. Direct Observation of the Multi-step Helix Formation of Poly-L-glutamic acids J. Am. Chem. Soc. 124. 11596-11597 (2002).
- 3) 高橋 聡 秋山修志 「蛋白質の折りたたみ運動をとらえる」蛋白質核酸酵素 46, 1514-1552 (2001).
- 4) 高橋 聡 「蛋白質の折り畳み研究の展開」生化学(2003) 印刷中  
国内招待講演 :11 件